



(19) AT PATENTSCHRIFT

(11) Nr. 374 367

(73) Patentinhaber: IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT FÜR CHEMISCH-  
-MEDIZINISCHE PRODUKTE  
WIEN, ÖSTERREICH

(54) Gegenstand: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES GEWEBEKLEBSTOFFES

(61) Zusatz zu Patent Nr.

(62) Ausscheidung aus:

(22) (21) Angemeldet: 1982 02 23, 683/82

(23) Ausstellungspriorität:

(33) (32) (31) Unionspriorität:

(42) Beginn der Patentdauer: 1983 09 15

Längste mögliche Dauer:

(45) Ausgegeben: 1984 04 10

(72) Erfinder: LINDNER ADOLF DR.  
WIEN, ÖSTERREICH  
LINNAU YENDRA DR.  
WIEN, ÖSTERREICH

(60) Abhängigkeit:

(56) Druckschriften, die zur Abgrenzung vom Stand der Technik in Betracht gezogen wurden:

AT 374 367

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Gewebeklebstoffes auf Basis von menschlichen oder tierischen Proteinen mit einem Gehalt an Fibrinogen und Faktor XIII sowie gegebenenfalls mit einem Gehalt an einem Plasmininhibitor, einem Antibiotikum und einem Cytostatikum.

5 Es ist bekannt, Blutgerinnungssubstanzen zur Stillung von Blutungen bzw. für Wundabdeckungen zu verwenden. Nach ersten derartigen Vorschlägen wurden Fibrintampons bzw. Fibrinblättchen verwendet. Ein Verfahren zur Herstellung von Gewebeklebstoffen aus Fibrinogen und Faktor XIII wurde in den AT-PS Nr. 359652 und Nr. 359653 beschrieben.

Es ist weiters bekannt, Gewebeklebstoffe in poriger Struktur auf Basis von Kollagen zum 10 Abdecken von Wunden zu verwenden, wobei ein aus Kollagenfasern bestehendes Vlies auf die Wundstelle aufgebracht wird.

Zur Fixierung des Kollagen-Vlieses wurde entweder ein Fibrinogen-Thrombin-Gemisch im Wundbereich oder auf die Innenseite des Kollagen-Vlieses appliziert und anschließend das Vlies auf die Wunde angedrückt. Dieses Verfahren hat jedoch den Nachteil, daß das Fibrinogen durch Thrombin 15 sehr rasch koaguliert und ein Eindringen in das Kollagen nicht möglich ist. Auch ist ein optimaler zeitlicher Ablauf des Vorganges der Fixierung mit Hilfe des Fibrinogen-Thrombin-Gemisches nur schwierig zu erreichen.

Weiters ist ein Material zum Heilen von Wunden bekannt (DE-OS 2914822), welches eine faserige Struktur z.B. aus Kollagen oder synthetischen Polymeren besitzt, an der Faktor XIII fixiert ist. 20 Dieses Material ist als Wundkleber nicht geeignet, weil es nur unter der Mitwirkung von im Wundbereich vorhandenen gerinnungswirksamen Faktoren funktionsfähig ist. Diese Faktoren sind jedoch nur in geringer Menge vorhanden und sind deshalb nicht ausreichend.

Die Erfindung bezweckt die Vermeidung dieser Nachteile und Schwierigkeiten und stellt sich die Aufgabe, ein Verfahren der eingangs bezeichneten Art zu schaffen, durch welches ein Gewebeklebstoff so ausgebildet werden kann, daß er unbeschränkt anwendbar, d.h. für Blutstillung, 25 Wundabdeckung und Gewebevereinigung einsetzbar ist, bei dessen Applikation keine besondere Vorbereitung des Wundgebietes notwendig ist und eine festere Wundabdeckung bzw. Verbindung gewährleistet ist.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß eine wässrige Mischung, enthaltend 30 ein gewebefreundliches Material, insbesondere Kollagen, Gelatine oder Polysaccharid, sowie Fibrinogen und Faktor XIII, bereitet und zu einem flächigen Gebilde geformt wird, welches unter Bildung eines Flachmaterials, wie eines Vlieses oder einer Folie, mit zusammenhängender Matrix aus gewebefreundlichem Material lyophilisiert wird.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Bereitung der Mischung und deren 35 Formung zu einem flächigen Gebilde, indem ein poriges Kollagenvlies mit einer wässrigen, Fibrinogen und Faktor XIII enthaltenden Lösung imprägniert wird.

Zweckmäßig wird ein vorgefertigtes poriges Kollagenvlies eingesetzt.

Vorzugsweise wird als poriges Kollagenvlies ein solches eingesetzt, das durch Lyophilisierung einer wässrigen Lösung von Kollagen in Schichtform erhalten wurde.

40 Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform werden zur mehrschichtigen Ausbildung des Flachmaterials die Formung der Mischung zu einem flächigen Gebilde und dessen Lyophilisierung mindestens einmal wiederholt.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in den folgenden Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1: 10 l gefrorenes humanes Frischplasma wird auf +2°C erwärmt und der Faktor XIII 45 sowie Fibrinogen enthaltende Kryoniederschlag durch Zentrifugieren gewonnen.

Die kältelöslichen Proteine werden aus dem Kryoniederschlag durch Extrahieren mit einer Pufferlösung extrahiert und entfernt. Die zurückbleibenden Proteine werden bei 37°C in 100 ml eines Zitrat-Glycin-Puffers, der Aprotinin (2500 KIE), Heparin (20 IE) und Amikacinsulfat (2000 mg) 50 enthält, gelöst und steriltfiltriert. Das Filtrat enthält mindestens 1000 Einheiten Faktor XIII und mindestens 7500 mg Fibrinogen.

Im Handel erhältliche Kollagen-Vliese werden in Flachstücke von etwa 70 cm<sup>2</sup> Größe geteilt, und jedes Flachstück wird unter sterilen Bedingungen mit 15 ml der Faktor XIII und Fibrinogen enthaltenden Lösung behandelt. Anschließend werden die Flachstücke gefroren, die angequollenen Stücke lyophilisiert und steril verpackt.

Statt vorgefertigte Kollagen-Flachstücke bzw. Vliese zu verwenden, können diese in einer Petrischale in situ durch Lyophilisieren gebildet werden, worauf das Imprägnierungsverfahren mit Faktor XIII und Fibrinogen enthaltender Lösung wie vorher beschrieben durchgeführt wird.

Beispiel 2: 10 l gefrorenes humanes Frischplasma wird auf +2°C erwärmt und der Faktor XIII sowie Fibrinogen enthaltende Kryoniederschlag durch Zentrifugieren gewonnen.

Die kältelöslichen Proteine werden aus dem Kryoniederschlag mittels einer Pufferlösung extrahiert und entfernt. Die zurückbleibenden Proteine werden in 100 ml eines Zitrat-Glycin-Puffers, der Aprotinin (2500 KIE), Heparin (20 IE) und Amikacinsulfat (2000 mg) enthält, gelöst und sterilfiltriert. Das Filtrat enthält mindestens 1000 Einheiten Faktor XIII und mindestens 7500 mg Fibrinogen.

Zu diesem Gemisch wird unter sterilen Bedingungen 100 ml sterile 1%ige Kollagenlösung zugesetzt. Danach wird diese Mischung in Portionen von 20 ml geteilt und auf Petrischalen verteilt, wobei Schichtdicken von 2 bis 5 mm gebildet werden. Dann werden die in den Petrischalen befindlichen Portionen gefroren und lyophilisiert, wobei porige Flachgebilde entstehen. Sie werden in den Petrischalen als Endcontainer steril verpackt. Bei der Applikation werden sie aus den Petrischalen genommen und auf den Wundbereich aufgelegt.

Beispiel 3: In gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben, wird aus gefrorenem humanem Frischplasma durch Gewinnung des Kryoniederschlages und Abtrennen der kältelöslichen Proteine das Faktor XIII und Fibrinogen enthaltende Proteingrundmaterial gewonnen, in einem Zitrat-Glycin-Puffer, der C<sub>1</sub>-Inaktivator (35 PI), Heparin (20 IE) und Glutaminsulfat (2500 mg) enthält, gelöst und sterilfiltriert.

Dem Auflösungspuffer können zusätzliche Mengen von Faktor XIII bis zur doppelten Menge der nativ enthaltenen Menge zugegeben werden, was bei einem Gehalt von einem Antibiotikum bevorzugt wird.

Zu diesem Gemisch wird unter sterilen Bedingungen die gleiche Menge einer, im Handel erhältlichen, 3,5%igen Gelatinelösung zugesetzt. Anschließend wird die Mischung, wie in Beispiel 1 beschrieben, in Petrischalen zu Flachgebilden geformt, die angequollenen Stücke werden lyophilisiert und steril verpackt.

Beispiel 4: Die Gewinnung des Faktor XIII und Fibrinogen enthaltenden Proteingrundmaterials erfolgt in gleicher Weise wie in den Beispielen 1 und 2, ebenso die Auflösung und Sterilfiltration der Zitrat-Glycin-Pufferlösung. Zu dem Filtrat wird die gleiche Menge von 6%iger Hydroxyäthylstärke zugemischt, die Mischung in Petrischalen portioniert und zu Flachgebilden geformt, sodann gefroren, lyophilisiert und steril verpackt.

#### P A T E N T A N S P R Ü C H E :

1. Verfahren zur Herstellung eines Gewebeklebstoffes auf Basis von menschlichen oder tierischen Proteinen mit einem Gehalt an Fibrinogen und Faktor XIII sowie gegebenenfalls mit einem Gehalt an einem Plasmininhibitor, einem Antibiotikum und einem Cytostatikum, dadurch gekennzeichnet, daß eine wässrige Mischung, enthaltend ein gewebefreundliches Material, insbesondere Kollagen, Gelatine oder Polysaccharid, sowie Fibrinogen und Faktor XIII, bereitet und zu einem flächigen Gebilde geformt wird, welches unter Bildung eines Flachmaterials, wie eines Vlieses oder einer Folie, mit zusammenhängender Matrix aus gewebefreundlichem Material lyophilisiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bereitung der Mischung und deren Formung in einem flächigen Gebilde erfolgt, indem ein poriges Kollagenvlies mit einer wässrigen, Fibrinogen und Faktor XIII enthaltenden Lösung imprägniert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein vorgefertigtes poriges Kollagenvlies eingesetzt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als poriges Kollagenvlies ein solches eingesetzt wird, das durch Lyophilisierung einer wässerigen Lösung von Kollagen in Schichtform erhalten wurde.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß zur mehrschichtigen Ausbildung des Flachmaterials die Formung der Mischung zu einem flächigen Gebilde und dessen Lyophilisierung mindestens einmal wiederholt werden.

---